

## CONSERVATION DU POLLEN DE CACTUS PAR CONGELATION

En 1955, dans le cadre de son travail de thèse à Wageningen, Tijs Visser s'intéresse au stockage et à la germination in vitro du pollen des poiriers et des pommiers. À cette occasion, il constate que le pollen germe mieux lorsque la teneur en eau a été abaissée et lorsqu'il a été conservé à très basse température. La viabilité n'est pas affectée après deux ans de stockage à moins 180°C.

C'est donc sur la teneur en eau et les différentes méthodes de conservation que vont se focaliser les recherches pendant deux à trois décennies. Il fallait non seulement que la viabilité du pollen soit conservée, mais aussi que l'intégrité des glycoprotéines de l'enveloppe externe soit maintenue afin que la reconnaissance par le stigmate permette la germination du pollen (Charrier 1990). Ces recherches ont d'abord été conduites sur les plantes ligneuses fruitières et forestières, puis sur les céréales.

Malgré les différences d'aptitude à la conservation selon les espèces, un consensus s'est dégagé sur l'abaissement de la teneur en eau au seuil de 5% à 2% par dessiccation sous vide à température ambiante et conservation à température négative. C'est sur la base d'une lyophilisation rapide et d'une conservation par congélation que s'est constituée la banque des pollens du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris à partir de 1983 (Cerceanu-Larrival, 1995). Parmi les 250 espèces embarquées figurait une cactée : *Harrisia nashii*. Peut-être y est-elle encore ?

En 1998 (a, b) et 2000, Julia Buitink explique le maintien de la viabilité des pollens par les mécanismes physiques et moléculaires de la vitrification du milieu intra-cellulaire (détaillée in Derouet 2010, page 18). Elle met en évidence les interactions entre la température de stockage, la teneur en eau et leur influence sur le vieillissement du pollen.

C'est en avril 2000 qu'une équipe israélienne (Metz, Nerd et Mizrahi) publie une technique de déshydratation du pollen afin de le conserver plusieurs mois par congélation pour réaliser la fécondation croisée de deux cactus (*Hylocereus undatus* et *H. polyrhizus*). Ces plants clonés destinés à produire des fruits pour la consommation sont autostériles et ont des pics de floraison décalés dans la saison.

La technique élaborée et les moyens adoptés semblent suffisamment simples pour être mis en œuvre par l'amateur de cactus.

### LA TECHNIQUE "DES HYLOCEREUS"

Les pollens de *Hylocereus undatus* et *H. polyrhizus* présentent une teneur en eau de 18% à 22% lorsqu'ils sont récoltés le matin et 45% à 50% le soir. On sait que les pollens riches en eau ne sont pas viables longtemps. Quelques heures au plus. Il faut donc les déshydrater.



Fruit de *Hylocereus undatus*  
Photo by Maja Dumat – flickr.com

## La déshydratation

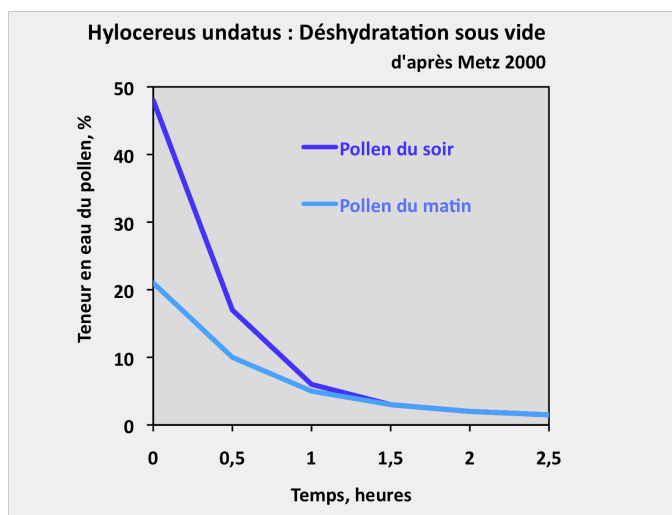
Elle a été pratiquée dans un dessiccateur sous vide partiel (une demi-atmosphère ou -50 kPa ou encore -38 cm de mercure par rapport à la pression atmosphérique moyenne). Le récipient contient des cristaux de gel de silice pour adsorber l'eau. Les pollens y séjournent deux heures et demie avant d'atteindre une teneur en eau d'environ 2%, quels que soient le genre ou l'heure de la récolte.

## La conservation

Dans cette expérience, les pollens ont été conservés à plusieurs températures : +4 au réfrigérateur, -18°C et -70°C en congélateurs et -196°C dans l'azote liquide pendant 3 mois et 9 mois. Seuls les résultats de 9 mois sont rapportés ici.

## La fécondation

La réhydratation du pollen se fait naturellement par contact avec le stigmate. Les fleurs pollinisées ont été fécondées à 100% pour les pollens congelés et seulement à 60% avec les pollens conservés à +4°C.



## La fructification

Pour les températures -18°C et -70°C, le poids des fruits produits (pitayas) a été le même que ceux récoltés en vergers (410 g pour *H. undatus* et 330 g pour *H. polyrhizus*) après fécondation avec du pollen frais quel que soit le genre. Les fruits issus du pollen conservé à -196°C ont un poids supérieur de 10% environ. Les pollens conservés à +4°C ont engendré des fruits de 20 à 30% plus légers.

## Les graines

Le nombre de graines récoltées figure dans le tableau ci-contre. Ces chiffres sont la moyenne de six échantillons par lot. Les tests in vitro de germination des graines ont été conduits avec 400 graines par lot.

Température de stockage	4°C	-18	-70	-196	Pollen frais
Hylocereus undatus					
Graines/fruit	2538	5014	5645	6067	5998
Germination %	94	95	96	94	96
Hylocereus polyrhizus					
Graines/fruit	2416	5084	4784	5072	4978
Germination %	85	91	---	90	93

## Bilan

Finalement, on voit que ces conditions testées avec succès en laboratoire puis en verger sont transposables dans le cadre d'une pratique domestique. En fait, il s'agit simplement de déshydrater le pollen sous un vide partiel et de le conserver dans le congélateur ménager.

## LA TECHNIQUE VULGARISEE

Chez les amateurs de cactus, jusqu'à maintenant, les pratiques de conservation du pollen frais au réfrigérateur permettent une fécondation pendant quelques jours seulement. Cette nouvelle technique de conservation à long terme va permettre la fécondation ou l'hybridation d'espèces dont le décalage de floraisons s'étend sur une saison entière.

### Fabrication du dessiccateur sous vide

Nous cherchons à atteindre une pression résiduelle de 50 kilopascals, c'est à dire un demi bar. Pour ce faire, nous devons vider le récipient de la moitié de son air.

#### Eléments techniques nécessaire

- Vacuomètre acheté chez ExpertByNet : 19,90€ + port  
<http://www.expertbynet.fr/fr/manometre-et-vacuometre-fioul/8682-vacuometre-rond-1-a-0-bars-diametre-63mm-m1-4-3283159024227.html>

- Mamelon en laiton : F 8x13 – M 12x17 : 1,45€ (rayon plomberie en bricolage)  
- Joints toriques en caoutchouc : deux de diamètre intérieur 6 mm, deux de diamètre intérieur 11 mm

- Rondelles en métal : une de diamètre intérieur 13 mm pour le vacuomètre et deux de 6 mm pour les valves.



#### Récipients

Prendre des bocaux dits "TO" (Twist Off). J'en ai choisi avec un couvercle de 104 mm comparé à un pot à confiture dont le diamètre externe est de 83 mm seulement. C'est peut-être un peu trop large car le couvercle devient très concave quand il est sous vide, avec un claquement caractéristique vers -0,2 bar.

Une option intermédiaire existe dans le cornichon à la russe (Kühne) avec un diamètre de 93 mm.

- Dessiccateur version pollen : un bocal de gésiers de canard confits et émincés à 6,00€. Le même récipient existe avec de la graisse de canard ou d'oie dans les deux euros...

- Dessiccateur version pollen et graines : un bocal de cassoulet à 5,70€



## Equipement

- Une perceuse
- Mèches à bois avec pointe de centrage de 6 mm et de 13 mm



## Perçages

- D'abord percer un trou de 3 mm à l'emplacement futur du vacuomètre afin d'y loger le centre de la mèche sans déformer le couvercle.
  - Ensuite commencer à percer le trou de 13 mm pour le vacuomètre à l'aide de la mèche à centrage par l'extérieur du couvercle sans traverser, seulement pour que la finition soit plus propre. Retourner le couvercle et finir le trou depuis l'intérieur du couvercle, sans forcer, tout en douceur.
- Enfin, à l'aide de la mèche de 6 mm, percer selon le même principe le trou de chacune des deux valves.



## Montage

Enlever la coque en caoutchouc autour du vacuomètre. Elle ajoute un volume inutile. Mettre un joint torique de 11 sur le vacuomètre et enfiler l'ensemble dans le trou du couvercle, À l'intérieur du couvercle, ajouter la rondelle de 13 puis le mamelon et serrer.

Si vous constatez un manque d'étanchéité, vous pouvez ajouter un joint plat en caoutchouc qui fera une assise plus large pour le joint torique sur le couvercle. Sur la photo ci-dessous, le joint à l'intérieur du couvercle, sous la rondelle, n'est pas indispensable.

Pour les valves : mettre le joint torique sur la valve, enfiler dans le trou du couvercle puis mettre une rondelle de l'autre côté du couvercle et la vis de serrage. Cette façon de faire est valable pour les deux valves, interne et externe.





Pour faire le vide, un groupe frigo récupéré sur un vieux réfrigérateur ou un congélateur constitue une excellente pompe à vide. Quelques secondes suffisent à atteindre une dépression de -38 cm de mercure.

Si vous n'avez pu en récupérer un, il existe aussi une possibilité manuelle.

## Dessiccateur version caviste

Une pompe à faire le vide dans les bouteilles de vin entamées peut très bien suffire à créer le vide nécessaire à la déshydratation du pollen. La pompe, et son bouchon réutilisable, se vendent entre 15 et 20€. Le vide à -50 kPa est rapidement atteint.

### Vacuomètre :

Même façon de faire que pour le modèle précédemment décrit.

### Vide manuel :

- Une jonction de montage Aqua Flow D1630 dont on ne va utiliser que la partie centrale (grise) : 1,25€

<http://www.leroymerlin.fr/v3/p/produits/jonction-de-montage-aqua-flow-d1630-e144630#&xtmc=jonction&xtr=2>

- Un mamelon réduit. La partie femelle recevra la partie centrale de la jonction et la partie mâle (diamètre 16,5 mm environ) traversera le couvercle.

- Des joints aux dimensions requises : un pour être entre le couvercle et le mamelon, deux (plats et ou toriques) superposés pour faire l'étanchéité entre la jonction en plastique et la partie femelle du mamelon.

- N'importe quel élément pour venir se visser sur le mamelon à l'intérieur du bocal.

- Mêmes récipients que pour la version "groupe frigo", diamètre du couvercle 104 mm ou légèrement inférieur (93 mm).

- Pompe à vin (Vacu Pump) : 15,90€

[http://www.boutique-bar.com/pompe-vin-vacu-pump-xml-244\\_408-1340.html](http://www.boutique-bar.com/pompe-vin-vacu-pump-xml-244_408-1340.html)

### Equipement nécessaire

Perceuse et deux mèches à bois avec pointe de centrage :

- Une de 13 mm
- Une de 16 mm

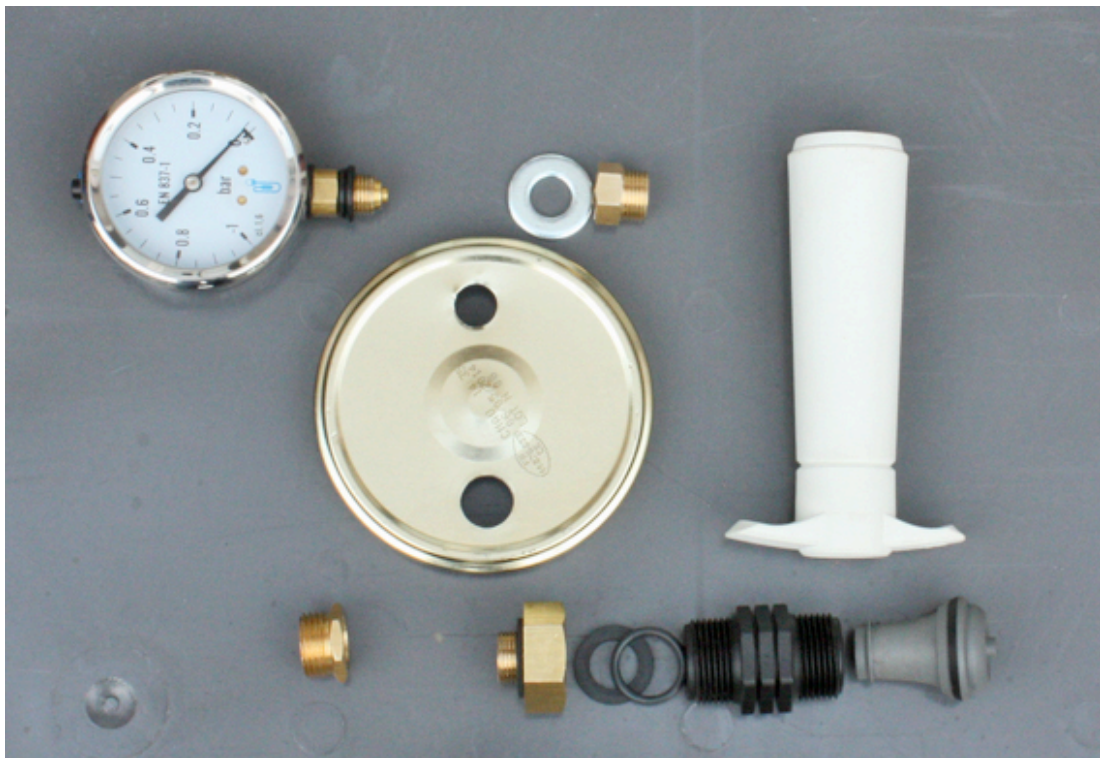
### Montage

Dans cette version, il n'y a que deux trous dans le





couvercle : un pour le vacuomètre et un pour la pompe à vide puisque le système utilisé permet aussi de faire rentrer l'air.



## Collecte du pollen

### L'entonnoir

Le pollen est récolté dans un sachet en papier cristal. Pour les grosses fleurs (*Epiphyllum*, *Selenicereus* et certains *Echinopsis*), la collecte peut se faire en secouant la fleur au-dessus d'un entonnoir relié au sachet en papier cristal.

### Les ciseaux

Pour les autres fleurs, on peut utiliser une paire de ciseaux et couper juste au-dessous de l'anthère déhiscente. Il suffit ensuite de verser dans le sachet les anthères et le pollen restés sur les lames des ciseaux.

### Le coton-tube

La technique des ciseaux présente l'inconvénient d'embarquer les sacs polliniques et les restes de l'anthère. Cet ensemble se retrouve ensuite sur le pinceau lors de la fécondation et pourrait concurrencer l'occupation de la surface des stigmates par le pollen. Pour séparer le pollen des sacs polliniques, il faut donc que cela se fasse à la collecte par une technique d'aspiration du pollen.

Les cotons tiges sont souvent en plastique creux. La solution est simple : un coton tige = deux cotons tubes. Ensuite, il faut relier le coton-tube au dispositif d'aspiration.

Il suffit alors de promener le coton tube parmi les étamines pour en aspirer le pollen. Avant d'arrêter l'aspiration, il faut redresser le tube et ensuite vider celui-ci dans un sachet et tapotant dessus, ou éventuellement en soufflant dans le coton tube avec délicatesse.



## Déshydratation du pollen

Le sachet contenant le pollen est plié et fermé avec un scotch puis mis dans le bocal dont le fond a été préalablement rempli avec un produit absorbant d'humidité.

Le vide partiel est fait dans le récipient. Le système est très hermétique car il peut conserver le même vide pendant très longtemps... autant qu'un vélo peut rester gonflé. Après 3 ou 4 heures, on considère que le pollen a atteint une teneur en eau compatible avec une congélation. On dévisse la valve et là, on entend le sifflement de l'air entrant dans le récipient. C'est aussi un moyen de vérifier que le vide avait bien été fait.



## Congélation du pollen

Les sachets de pollen sont alors stockés au congélateur dans un bocal hermétique avec des cristaux de gel de silice afin de maintenir la déshydratation.

## RESULTATS

### Influence de la technique de collecte du pollen sur la qualité de la fécondation

Dans un premier temps, la collecte du pollen s'effectuait en coupant aux ciseaux la partie supérieure des étamines avec leur sac pollinique. L'hypothèse d'une compétition des débris des sacs polliniques avec le pollen sur le stigmate a suscité la comparaison "aspiration" et "ciseaux" sur le nombre de graines par fruit.

Le pollen a donc été, soit aspiré sur une fleur, soit collecté avec des ciseaux sur une autre fleur de la même plante, le même jour.

Les fécondations ont également eu lieu évidemment sur deux fleurs différentes d'une même plante, le même jour. La récolte des fruits de chaque plante a lieu le même jour.

MERE		PERE		POLLEN CONGELE			Nombre de graines Selon collecte du pollen	
Genre	Espèce	Genre	Espèce	Recolte	Fecond.	Jours	ciseaux	aspiration
Echinopsis	cv Paul Schmitt	Echinopsis	blanc FB	23/04/11	24/04/11	1	356	318
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	oxygona	23/04/11	24/04/11	1	338	148
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	rose MAD	23/04/11	24/04/11	1	361	313
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	blanc FB	23/04/11	24/04/11	1	651	582
Echinopsis	rose MAD	Echinopsis	sp fleur jaune	23/04/11	24/04/11	1	319	365
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	cv Terra Cota	23/04/11	22/05/11	29	381	311

Certes, c'est sur un petit nombre mais on constate que l'hypothèse de départ n'était pas fondée car dans le cas présent, constitué uniquement d'Echinopsis, les fécondations par le pollen collecté avec des ciseaux engendrent en moyenne un peu plus de graines (400 vs 340). Les deux techniques restent donc envisageables.

### Influence d'un vide plus poussé sur le nombre de graines produites.

Dans leur publication, Metz *et al.* recommandent un vide de -0,50 kPa. Il était intéressant de voir si l'amateur pouvait se dispenser d'un vacuomètre pour apprécier la dépression dans son récipient de déshydratation.

Les pollens ont été prélevés, ensachés et déshydratés sous un vide poussé entre -0,88 et -0,92 kPa pendant 3 à 4 heures, puis congelés. Douze fleurs ont été fécondées avec ces pollens et la moitié d'entre elles n'ont pas fait de fruit.

Ces résultats sont à comparer avec les résultats des 17 fécondations obtenues sur Echinopsis avec le pollen 2011 qui lui, était déshydraté sous -0,50 kPa. Le nombre moyen de graines obtenues par fruit était de 417.

On constate que Echinopsis sp. "fleur jaune" semble très sensible, ce qui n'est pas le cas pour Harrisia sp. La sensibilité au vide poussé n'est peut-être pas la même pour toutes les espèces...

MERE		PERE		POLLEN CONGELE VIDE 0,88 à 0,92			Nb
Genre	Espèce	Genre	Espèce	Recolte	Fecond.	Jours	graines
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	cv Terra Cota	22/06/11	24/08/11	59	394
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	fleur blanche DM	23/06/11	12/08/11	47	0
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	fleur blanche DM	23/06/11	24/08/11	62	0
Echinopsis	sp fleur jaune	Echinopsis	fleur blanche DM	23/06/11	12/08/11	50	517
Echinopsis	leucantha	Harrisia	sp	23/06/11	27/07/11	34	2050
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	23/06/11	1	0
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/09/11	2	0
Echinopsis	cv Terra Cota	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/09/11	2	0
Echinopsis	cv rose MAD	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	25/06/11	3	0
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/08/11	59	33
Echinopsis	oxygona	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/07/11	32	32
Echinopsis	cv rose MAD	Echinopsis	sp fleur jaune	22/06/11	24/08/11	59	51

Ce n'est certainement pas par hasard que l'équipe de Metz a fixé la valeur du vide à -0,5 kPa. Il semble bien qu'il y ait un effet délétère sur la viabilité du pollen et il est donc indispensable de s'équiper d'un vacuomètre afin de stabiliser le vide à environ -0,50 kPa.

### Influence de la longévité du stockage du pollen sur le nombre de graines produites

Après 3 années de stockage au congélateur, le pollen reste viable, même après plusieurs brèves sorties à température ambiante pour fécondation, comme ci-dessous pour 3 pollens :

Echinopsis mère		Echinopsis père		Pollen congelé du	Fécondation le	nb de jours	nb de graines
E.	eyriesii	E.	oxygona	29/04/10	07/09/13	1227	507
E.	eyriesii	E.	werdermanniana	28/04/10	07/09/13	1228	771
E.	sp fleur blanc cassé	E.	eyriesii	08/04/10	07/09/13	1248	366
E.	sp fleur blanc cassé	E.	eyriesii	08/04/10	07/09/13	1248	363
E.	sp fleur blanc cassé	E.	oxygona	29/04/10	07/09/13	1227	368
E.	sp fleur jaune	E.	eyriesii	08/04/10	31/08/13	1241	187
E.	sp fleur jaune	E.	oxygona	29/04/10	04/09/13	1224	302
E.	sp fleur rose rayé	E.	eyriesii	08/04/10	31/08/13	1241	162

### CONCLUSION

Après trois années de tests, la démonstration est faite que la technique est fiable et qu'elle est suffisamment simple pour être mise en œuvre par le collectionneur. Elle devrait permettre d'aborder des croisements jusqu'alors impossibles du fait du décalage des floraisons.

Il y a donc là une technique d'avenir et des perspectives inédites pour les amateurs et les obtenteurs.

## BIBLIOGRAPHIE

- Buitink J., Walters C., Hoekstra F.A. & Crane J., 1998a, Storage behavior of *Typha latifolia* pollen at low water contents : interpretation on the basis of water activity and glass concepts., *Physiologia Plantarum*, 103 : 145–153.
- Buitink J., Claessens M.A.E., Hemminga M.A., Hoekstra F.A., 1998b, Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seed and pollen, *Plant Physiol.*, 118 : 531-541
- Buitink J., Leprince O., Hemminga M. A., Hoekstra F. A., 2000, The effects of moisture and temperature on the ageing kinetics of pollen : interpretation based on cytoplasmic mobility, *Plant, Cell & Environment*, 23, 9 : 967–974
- Cerceau-Larrival M.-Th. , Delange Y. , Youmbi E. , Derouet L. , Verhille A.-M. and Carbonnier-Jarreau M.-C., 1995, Contribution à la préservation du patrimoine génétique mâle des collections végétales vivantes du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, *Grana*, 34, 6 : 371 — 407
- Charrier A., 1990, Pollen et ressources génétiques, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 2 : 101-104.
- Derouet M., 2010, Graines de cactées, de la fleur à la plantule, page 18.  
[http://www.cactuspro.com/articles/graines\\_de\\_cactees\\_de\\_la\\_fleur\\_a\\_la\\_plantule](http://www.cactuspro.com/articles/graines_de_cactees_de_la_fleur_a_la_plantule)
- Metz C., Nerd A., Mizrahi Y., 2000, Viability of pollen of two fruit crop cacti of the genus *Hylocereus* is affected by temperature and duration of storage, *HortScience*, 35, 2 : 199-201
- Visser T., 1955, Germination and storage of pollen, Thesis, Mededelingen van de Landbouwhogeschool 55 (1) : 68p, NL

**Summary :** Long-term storage of pollen is interesting for cacti enthusiasts seeking crosses. This paper popularize a home-made experiment based on the study developed by Metz *et al.* (2000).

To obtain an efficient preservation of viable pollen, two processes are required : first dehydration in a vacuum (about -50kPa) dessicator at room temperature until the moisture content is reduced to 5% (about 3 hours) and second, storage at subfreezing temperature. In practice, the vacuum is performed by syringe, vacuum wine saver pump or refrigerating unit and the storage in a household freezer. For pollination, the pollen is applied to mature stigmas able to rehydrate the dried pollen. Under these conditions, we obtain fruits and seeds after three years of storage.

**Key words :** cactus, pollen, seed, dehydration, dessiccation, conservation, freezing

Je remercie Georges Marchand (†) et Jean-Didier Hary pour leur amicale collaboration.

Michel Derouet  
michelderouet@orange.fr  
Dernière mise à jour 14 mai 2014